

学 位 論 文 題 名

海産生物に含まれる有用生化学資源に関する研究
—特に海藻の α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質について—

学位論文内容の要旨

本研究は海産生物の有用生化学資源を探索することを目的とし、スクリーニング法の検討と酵素阻害・抗菌性スクリーニング、酵素阻害物質の特性に関する研究を行った。海産生物としては海藻と無脊椎動物を対象とし、栄養学・食品学的に重要な3種類の酵素、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、チロシナーゼに対する阻害性と抗菌性を検討した。

α -グルコシダーゼ（マルターゼ、スクラーゼ）は α -グルコシド配糖体を加水分解し、炭水化物の最終消化に関与している。摂取した炭水化物はまず二糖類まで消化され、小腸膜の α -グルコシダーゼによりグルコースなどの単糖類に加水分解される。グルコースは吸収され食後高血糖状態を引き起こすので、糖尿病患者ではこの状態にならないようにする必要がある。最近、 α -グルコシダーゼを阻害することにより二糖類の加水分解を抑制する方法が注目を浴びており、 α -グルコシダーゼ阻害物質の糖尿病患者への適用が期待できる。

β -グルコシダーゼは β -グルコシド配糖体を加水分解する。ヒトは β -グルコシダーゼを消化管に持たないが、腸内細菌がこれを生

産する。 β -グルコシダーゼは摂取した毒性物質配糖体を加水分解し毒性を発現に関与するので、この酵素を阻害することで外来毒性配糖体の毒性発現を抑制することが期待できる。

チロシナーゼはチロシンやドーパの酸化を行う酵素でメラニン生成に関与する。メラニン生成作用は、エビの黒変、野菜・果実の褐変など貯蔵時の食品の品質劣化に、また、ヒトのシミ・ソバカス生成などにも関与している。エビ黒変の抑制や美白作用化粧品としてチロシナーゼ阻害物質の利用が期待できる。

本研究では以下の3点を明らかにした。

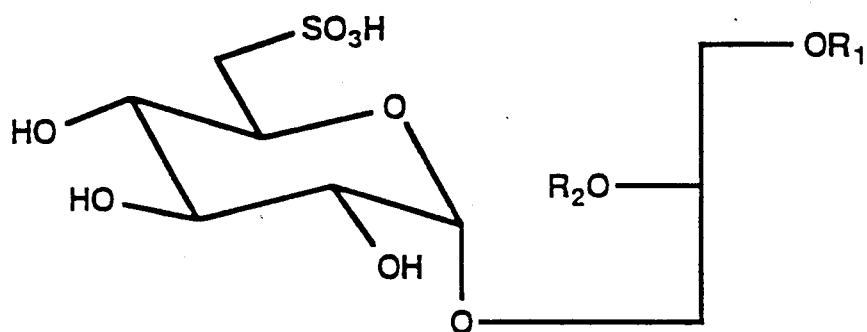
(1) 酵素阻害・抗菌性スクリーニングのために抗生物質一次スクリーニングに使われている寒天平板法の適用を試みた。 α -および β -グルコシダーゼ阻害性試験では、それぞれ p -ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシドおよび β -D-グルコピラノシドを基質として用いた。これらの基質を含む「基質寒天平板」を作製し、別途に、酵素を表面に塗布した「酵素寒天平板」を作製した。被験物質含有ペーパーディスクを酵素寒天平板に埋め込み、被験物質を十分に拡散させた。基質寒天平板を酵素寒天平板上にのせ酵素反応を開始した。酵素反応が進行すると p -ニトロフェノールが遊離して黄色を呈し、酵素反応が被験物質により阻害される場合には p -ニトロフェノールが生成せずは無色のままであった。本方法はグルコシダーゼ阻害性試験において初めて視覚的な判別方法として確立できた。

チロシナーゼ阻害試験では、基質としてチロシンを含む寒天平板を作製した。チロシナーゼ溶液を表面に塗布後に、寒天平板上に被験物質含有ペーパーディスクをのせた。酵素反応が進行した

場合には黒色を呈し、酵素反応が阻害された場合には無色のままであった。

簡便にスクリーニングが行えるこれらの寒天平板法により、供試生物の有機溶媒抽出物を酵素阻害性と抗菌性試験に供した。その結果、 α -グルコシダーゼ阻害性は海藻9種類、水生植物1種類、無脊椎動物4種類、市販水産食品4種類で、 β -グルコシダーゼ阻害性は海藻7種類、無脊椎動物2種類、市販水産食品5種類で確認できた。また、チロシナーゼ阻害性は海藻3種類、無脊椎動物3種類で、抗菌性を示したのは海藻5種類、無脊椎動物7種類で確認できた。

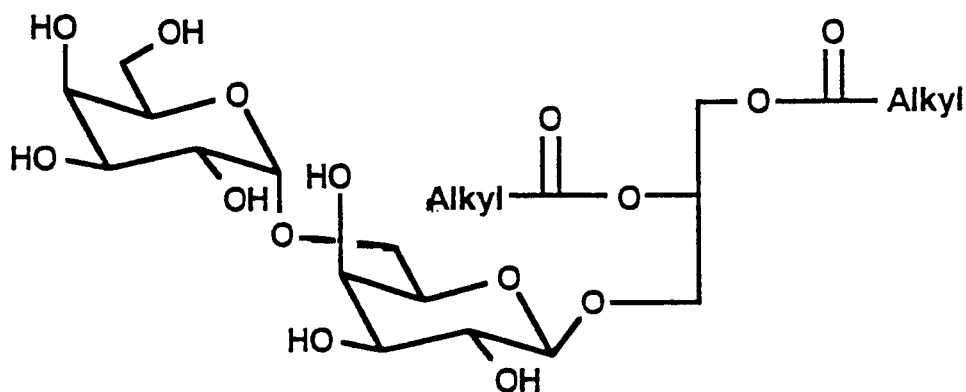
(2) ヒジキ (*Hizikia fusiforme*) に含まれる α -グルコシダーゼ阻害性成分の特性を明らかにした。 α -グルコシダーゼ阻害性試験の結果を指標にして、ヒジキの *n*-ブタノール抽出物からシリカゲル・セファデックス LH-20 カラムおよび薄層クロマトグラフィーで2種類の阻害物質を単離した。各種機器分析の結果から阻害物質の構造を植物の主要な糖脂質である 1,2-ジアシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロール (SQDG, 1) とそのリゾ体の 1-アシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-*sn*-グリセロール (SQMG, 2) と同定した。



$R_1=R_2=\text{Acyl}$ SQDG (1)
 $R_1=\text{Acyl}, R_2=\text{H}$ SQMG (2)

(3) ヒジキ SQDG と SQMG の α -グルコシダーゼに対する阻害活性を求めた。ヒジキ SQDG は酵母 α -グルコシダーゼに対して拮抗阻害を示し、その阻害物質定数 K_i は $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ だった。ヒジキ SQDG の阻害活性を他植物 SQDG の阻害活性と比較するために、市販 (Plant leaf 由来) SQDG とフジマツモ (*Rhodomela larix*) SQDG の阻害活性を求めた。両者ともに拮抗阻害を示し、 K_i の値も同じであることから、構成脂肪酸の違いは酵素阻害活性に影響を与えないことが明らかとなった。阻害率の比較によりヒジキ SQMG の阻害活性は SQDG の阻害活性より強かった。

SQDG を単離する過程で粗糖脂質画分が SQDG の α -グルコシダーゼ阻害を抑制することを確認した。その原因を検討したところ、植物糖脂質の 1,2-ジアシル-3-(6- α -D-ガラクトピラノシル- β -D-ガラクトピラノシル)-sn-グリセロール (DGDG, 3) が SQDG の α -グルコシダーゼ阻害性を抑制した。



DGDG (3)

速度論的解析から、SQDG と DGDG 存在下での α -グルコシダーゼ反応の速度式 (1) は、

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{S + K_m \times \left(1 + \frac{[SQDG]}{K_i} \times \frac{[SQDG]}{[SQDG] + c_{dil} \times [DGDG]} \right)} \quad (1)$$

ただし、 v : 反応速度

$V_{\max}$: 最大速度

S : 基質濃度

K_m : ミカエリス定数

K_i : 阻害物質定数

$[SQDG]$: SQDG濃度

$[DGDG]$: DGDG濃度

c_{dil} : 希釈係数

のようになる。すなわちDGDGが存在すると拮抗阻害反応速度式の $[SQDG]$ に $[SQDG]/([SQDG] + c_{dil} \times [DGDG])$ ($=A$) が乗じられている。 c_{dil} が1であるならば、 A はSQDGのモル分率に他ならない。しかし、本研究において c_{dil} は10.3と求められ、DGDG 1分子がSQDG 10.3分子に相当することを考慮したSQDGの分率を表している。また、DGDGは単独では α -グルコシダーゼに対して阻害も促進効果も示さなかった。これらの結果から考察するとDGDGは酵素に影響を与えているのではなく、SQDGと混合ミセルを形成することでSQDGの阻害効果を抑制（希釈）していることを明らかにした。

本研究において海産生物成分の有効利用のために酵素阻害性・抗菌性をスクリーニングした結果、新たな利用方途を期待できる海産生物成分を多数明らかにできた。そのうち海藻から得られた α -グルコシダーゼ阻害物質の構造を解析したところ、既知化合物ではあったが植物糖脂質と同定できた。植物糖脂質の α -グルコシダ

一ゼ阻害性はこれまでに報告例がなく、新たな利用方途の開発を期待できる。さらに、SQDGとDGDGが混合状態で存在したときにSQDGの酵素阻害性が抑制されることを明らかにし、速度論的解析によりこれまでに報告例のない抑制メカニズムを推定した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 羽田野 六 男

副 査 教 授 西 田 清 義

副 査 助教授 高 橋 是太郎

学 位 論 文 題 名

海産生物に含まれる有用生化学資源に関する研究

—特に海藻の α -グルコシダーゼ阻害性糖脂質について—

本研究は海産生物の有用生化学資源を探索することを目的とし、海藻と無脊椎動物を対象に、栄養学・食品学的に重要な2種類の酵素 α -グルコシダーゼと β -グルコシダーゼについて、その活性阻害性スクリーニング法の検討と酵素阻害物質の特性に関する研究を行ったものである。

本論文では以下の3点を明らかにした。

(1) α -と β -グルコシダーゼ阻害性試験法として p -ニトロフェニル- $\alpha(\beta)$ -D-グルコピラノシドを基質とした寒天平板法を考案し、その適用を試みた。これらの基質を含む「基質寒天平板」を作製、別途に、酵素を表面に塗布した「酵素寒天平板」を作製した。被験物質含有ペーパーディスクを酵素寒天平板に埋め込み、被験物質を十分に拡散させた。基質寒天平板を酵素寒天平板上にのせ酵素反応を開始させ、酵素反応が進行すると p -ニトロフェノールが遊離して黄色を呈し、酵素反応が被験物質により阻害される場合には p -ニトロフェノールが生成せずに無色のままであった。このことから本法はグルコシダーゼ阻害性試験において初めて視覚的な判別方法として確立できた。

この簡便にスクリーニングが行える寒天平板法によって、供試生物の有機溶媒抽出物の酵素阻害性を検討した。その結果、 α -グルコシダーゼ阻害性は海藻9種、水生植物1種、無脊椎動物4種、市販水産食品4種類で、また、 β -グルコシダーゼ阻害性は海藻7種、無脊椎動物2種、市販水産食品5種類で確認できた。

(2) 食用海藻のヒジキ (*Hizikia fusiforme*) に含まれる2種類の α -グルコシダーゼ阻害性成分の特性を明らかにした。 α -グルコシダーゼ阻害性試験の結果を指標にして、ヒジキの n -ブタノール抽出物からシリカゲルカラムとセファデックスLH-20カラムおよび調製薄層クロマトグラフィーで2種類の阻害

物質を単離した。各種機器分析の結果からこれらの阻害物質の構造を糖脂質である1,2-ジアシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-sn-グリセロール(SQDG)と1-アシル-3-(6-スルホ- α -D-キノボピラノシル)-sn-グリセロール(SQMG)と同定した。

(3) ヒジキSQDGとSQMGの α -グルコシダーゼに対する阻害活性を求めた。ヒジキSQDGは酵母 α -グルコシダーゼに対して拮抗阻害を示し、その阻害物質定数は $2.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ だった。ヒジキSQDGの阻害活性を他植物由来のSQDGの阻害活性と比較するために、市販(Plant leaf)SQDGとフジマツモ(*Rhodomela larix*)SQDGの阻害活性を求めた。両者ともに拮抗阻害を示し、阻害物質定数の値もヒジキのそれと同じであることから、これらの糖脂質の構成脂肪酸の違いは酵素阻害活性に影響しないことを明らかにした。また、ヒジキ中のSQMGとSQDGの阻害活性を比較した結果、SQMGの方が強かった。

SQDGを単離する過程で粗糖脂質画分にSQDGの α -グルコシダーゼ阻害を抑制することを確認した。その原因を検討したところ、糖脂質の1,2-ジアシル-3-(6- α -D-ガラクトピラノシル- β -D-ガラクトピラノシル)-sn-グリセロール(DGDG)が存在し、このものがSQDGの α -グルコシダーゼ阻害性を抑制することを明らかにした。また、DGDGは単独では α -グルコシダーゼに対して阻害も促進効果も示さないことから、DGDGによる α -グルコシダーゼ阻害抑制はSQDGとの共存下においてのみ示すことが予想された。これら共存下の反応を速度論的に解析を行った結果、DGDGは酵素に直接影響を与えているのではなく、SQDGと混合ミセルを形成することでSQDGの阻害効果を抑制していることが判明した。

これらの研究結果から、新たな利用方法が期待できるグルコシダーゼ活性阻害成分をもつ海産生物の存在が多数明らかになった。また、食用海藻ヒジキから既知化合物ではあったが、 α -グルコシダーゼ活性阻害性糖脂質を単離、同定した。この糖脂質の α -グルコシダーゼ阻害性と共存する他の糖脂質の抑制メカニズムについては、これまでに報告例がなく、新知見である。

これらの作用は食餌性糖質の消化を抑え、食後の血糖上昇を抑制することにもなることから、糖尿病の予防にも期待される点大きい。

よって、本論文は海産生物の天然物化学分野のみならず、水産食品に新たな機能性があることも明らかにした点など栄養面からも寄与するところが評価される。審査員一同は学位申請者が博士(水産学)の学位を受けるに十分な資格があるものと判定した。